植 物 分 类 与 资 源 学 报 2013，35 (6)：761~768
Plant Diversity and Resources DOI：10.7677/ynzwyj201313192

DNA 条形码在生态学研究中的应用与展望*

罗亚皇[1,2,3,4]，刘　杰[1]，高连明[1**]，李德铢[1,2**]
(1 中国科学院昆明植物研究所生物多样性与生物地理学重点实验室，云南 昆明 650201；2 中国科学院西南野生生物种质资源库，云南 昆明 650201；3 中国科学院大学，北京 100049；4 云南大学生命科学学院，云南 昆明 650091)

摘要：DNA 条形码是利用标准的 DNA 片段对物种进行快速鉴定的技术，已在生物学各相关领域得到广泛应用。随着 DNA 条形码技术的不断发展和完善，已成功应用于生态学领域的相关研究中。本文综述了 DNA 条形码在物种快速鉴定和隐存种发现、群落系统发育重建和生态取证、群落内物种间相互关系研究等方面的应用，并介绍了 DNA metabarcoding 技术和环境 DNA 条形码在生物多样性和生态学研究领域中的应用。最后，结合新的测序技术和未来大科学装置的发展，在相关数据库逐渐完善，新分析方法和计算模型不断开发使用的情景下，对 DNA 条形码在生态学相关领域的应用前景进行了展望。

关键词：生物多样性；群落系统发育；DNA metabarcoding；环境 DNA 条形码；第二代测序技术
中图分类号：Q 948，Q 781　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：2095-0845(2013)06-761-08

Applications and Advances of DNA Barcoding in Ecological Studies

LUO Ya-Huang[1,2,3,4], LIU Jie[1], GAO Lian-Ming[1**], LI De-Zhu[1,2**]
(1 *Key Laboratory of Biodiversity and Biogeography*, *Kunming Institute of Botany*, *Chinese Academy of Sciences*, Kunming 650201, China; 2 *Germplasm Bank of Wild Species in Southwest China*, *Kunming Institute of Botany*, *Chinese Academy of Sciences*, Kunming 650201, China; 3 *University of Chinese Academy of Sciences*, Beijing 100049, China; 4 *School of Life Sciences*, *Yunnan University*, Kunming 650091, China)

Abstract: DNA barcoding is a technique used to identify species, which is now widely employed in different biological disciplines. With the development and modification of DNA barcoding, it has become a useful tool for ecological studies. Here, we review the uses of DNA barcoding for quick species identification and/or new and cryptic species discovery, in community phylogenetic reconstruction and ecological forensics, and in interaction networks among species within a community. The techniques of DNA metabarcoding and environmental DNA metabarcoding used in ecological research such as diet analysis and biodiversity assessment are also examined. Finally, we discuss the future prospects of DNA barcoding in ecological research following the development of next-generation sequencing technologies, improvement of Large-scale Scientific Facilities, and use of new models and software for data analysis.

Key words: Community phylogeny; Environmental DNA barcoding; DNA metabarcoding; Biodiversity; Next generation sequencing

随着社会的进步和经济的快速发展，人类对生物多样性的认识和资源的保护及可持续利用越来越关注，而物种的准确鉴定是探索、认识和保护生物多样性的基础。DNA 条形码是通过一

* 基金项目：科技部重大研究计划项目（2014CB954100）；科技基础性工作专项项目（2012FY110800，2013FY112600）；中国科学院大科学装置项目（2009-LSFGBOWS-01）
** 通讯作者：Author for correspondence；E-mail：gaolm@mail.kib.ac.cn；dzl@mail.kib.ac.cn
收稿日期：2013-09-22，2013-09-30 接受发表
作者简介：罗亚皇（1987-）男，在读博士研究生，主要从事群落系统发育研究。E-mail：luoyahuang@mail.kib.ac.cn

段或几段短的、通用的标准 DNA 序列对物种进行识别和鉴定的技术（Hebert 等，2003；Kress 等，2005；Hollingsworth 等，2011），自 2003 年加拿大学者 Paul Hebert 等提出这一概念后，DNA 条形码在生物学各相关领域中得到了广泛应用，且已成为生物学研究领域发展最迅速的前沿之一（Hollingsworth 等，2011）。植物 DNA 条形码不仅是传统植物分类与鉴定的有力补充，而且可使标本鉴定过程实现自动化和标准化，突破了对经验的过度依赖，能够在较短时间内建立形成易于利用的应用系统。因此，植物 DNA 条形码技术作为传统植物分类的有效补充，在物种分类和鉴定方面展示出了强大的生命力，在生物多样性调查与监测、分子系统发育与进化、生态学、食品安全、生物检验检疫、法医学、流行病学等领域具有广阔的应用前景（李德铢等，2012）。随着 DNA 条形码技术的发展与其标准化和自动化鉴定的不断完善，该技术在生态学研究中也得到了广泛的应用。本文重点综述了 DNA 条形码技术在物种快速鉴定及隐存种的发现、群落构建机制及群落中种间相互关系的研究；并介绍了 DNA metabarcoding 技术在生物多样性评估和环境 DNA 条形码在生态学研究中的应用；最后对 DNA 条形码在生态学研究中的应用进行了展望。

1 DNA 条形码在加速物种鉴定和揭示隐存生物多样性中的应用

DNA 条形码技术作为物种快速鉴定和发现新物种的工具已得到广泛应用。线粒体细胞色素 c 氧化酶 I 基因（*CO1*）已经作为标准条形码广泛用于鉴定动物物种（Hebert 等，2003）；核糖体 16SRNA 常用于细菌的鉴定（Sogin 等，2006；Flanagan 等，2007）；而 ITS 则作为真菌的标准条形码用于物种鉴定（Nilsson 等，2008；Schoch 等，2012）。过去几年中，植物中选择哪些片段作为 DNA 条形码一直在探讨之中，国际生物条形码联盟（Consortium for the Barcode of Life，CBOL）植物工作组（Plant Working Group）2009 年通过对 7 个 DNA 候选条形码的综合评价，推荐 *rbc*L+*mat*K 组合作为陆地植物的核心条形码（CBOL Plant Working Group，2009）。2011 年，中国植物条形码工作组通过对大规模数据的综合分析，建议 ITS（或 ITS2）应作为种子植物的核心条形码之一（Li 等，2011）。目前通常采用 *rbc*L+*mat*K+ITS 的组合作为植物的标准 DNA 条形码用于物种鉴定。植物条形码的确定，为开展植物 DNA 条形码的物种鉴定工作奠定了坚实的基础。

DNA 条形码技术不仅是传统经典分类鉴定的补充，而且通过特定的程序和步骤将标本鉴定过程实现自动化。对于生态学研究来说，对物种进行准确鉴定，是认识生物多样性和开展其他生态学研究的基础和前提（高连明等，2012）。然而，通过形态学特征对物种进行鉴定往往具有局限性，如很多形态特征具有可塑性，并且自然界中很多类群存在隐存种现象（Knowlton，1993）。此外，有时一些关键的形态性状只有在某一特定的生活史阶段或者性别中才得以显示，如鉴定一些双翅目昆虫时，主要根据雄虫的外生殖器进行鉴定（Hennig，1976）。在植物标本鉴定中需要有花、果等特征才能对物种进行鉴定，因此，开展野外生态学调查时就需要经验丰富的分类学专家配合才能准确鉴定植物物种。由于采集热带雨林或亚热带常绿阔叶林中一些林冠层物种的花和果实标本十分困难，而利用其叶片或树皮等进行 DNA 条形码分析，可以将其快速鉴定到种、属或科（Dexter 等，2010；Pei 等，2011），因此 DNA 条形码可以帮助生态学家快速进行物种鉴定。目前 DNA 条形码技术可以解决在缺乏有效的形态学证据时鉴定已知或未知的物种（Ahrens 等，2007），而且该技术的应用加快了生态学研究中对物种鉴定的速度，同时也提高了鉴定的准确度（Dexter 等，2010；Costion 等，2011）。

发现新种或隐存种（cryptic species）是一项复杂的系统性工作，DNA 条形码可提供重要线索。尽管它并不能取代传统形态鉴定，但是通过 DNA 条形码比较不同居群和物种间的遗传差异，如果种内变异大于种间的变异，则居群群间可能存在生殖隔离，进而产生分化，但新种的最终确定仍需整合其他如形态、理化特性等多重数据进行综合分析和判断。Hebert 等（2004）通过对弄蝶科的一种蝴蝶（*Astraptes fulgerator*）进行 DNA 条形码研究，结合在哥斯达黎加西北部 25 年的野外观测数据，发现传统认为的 *A. fulgerator* 至

少包括 10 个物种在该地区同域分布，尽管成虫的生殖器没有明显分化，这些物种的幼虫有各自的植食性和生境偏好。研究表明在热带地区普遍存在隐存种现象，结合传统分类和 DNA 条形码技术有助于人类认识隐存的生物多样性。Lahaye 等（2008）利用 *mat*K 基因对分布于南美洲的 1 000 多种兰花进行 DNA 条形码研究，表明 DNA 条形码可对隐存种及国际贸易公约列出的濒危物种名录（CITES）中的物种进行有效鉴定。Liu 等（2011）对欧亚分布的红豆杉属植物 DNA 条形码研究发现，这一地区包括红豆杉属 11 个种（或谱系），其中有 4 个物种（谱系）可能是新种或隐存种，而这一结果得到了居群遗传学（Liu 等，2013）和形态学（Möller 等，2013）的进一步支持。因此，DNA 条形码一方面可以帮助生态学家快速鉴定物种，另一方面弥补了传统分类的不足，有助于发现新种或隐存种，增加对生物多样性的认识。

2　DNA 条形码在群落系统构建与生态取证中的应用

群落生态学（community ecology）研究生物之间的相互作用，以及它们的起源与进化的过程（Webb 等，2002；Ackerly，2004；Cavender-Bares 等，2004；Gillespie，2004；Davies 等，2007）。有关群落中生物多样性的形成和维持机制一直是生态学研究的核心论题。尽管有很多假说，如中性假说、生态位假说、中度干扰假说、负密度制约假说、种子散布限制假说、种库假说、能量假说、生态学代谢假说、地史成因假说等，试图去揭示生物多样性的维持机制（Janzen，1970；Wright，1983；Connell，1984；Ricklefs，1987，2004；Zobel，1997；Hubell，2001；Fargione 等，2003；Mouquet 等，2004；Tilman，2004；Brown 等，2004），但是目前对群落构建和生物多样性维持的机理仍然不是十分清楚。随着分子系统学的快速发展和测序成本的降低，目前已积累了大量的系统发育数据。此外，计算工具及计算能力的迅速发展也使得系统发育分析变得更加容易，促进了将系统发育分析方法应用到群落生态学研究中，使得系统发育群落生态学（phylogenetic community ecology）得到迅速发展（Webb 等，2002；Cavender-Bares 等，2009）。

生态学研究不仅要考虑到物种多样性（Species diversity，SD），也要考虑系统发育多样性（Phylogeny diversity，PD）和功能多样性（Function diversity，FD）（Webb 等，2002；Sweason，2011）。相对于物种多样性，系统发育多样性和功能多样性更能预测生态系统功能与动态（Cadotte 等，2008，2009）。早期的生态学家在构建植物群落内物种系统发育树时，通常是基于 APG 分类系统，利用 Phylocom 和 Phylomatic 进行系统发育树的构建（Kembel 和 Hubbell，2006；Letcher，2010）。但是，通过该方法构建的系统发育树对物种的分辨率不高且所包含的信息不够完全，将 DNA 条形码数据应用于群落系统发育时所构建的群落系统发育树可能更加完善并且精确度更高（Kembel 和 Hubbell，2006；Kress 等，2009；Gonzalez 等，2010）。Kress 等（2009）利用植物 DNA 条形码方法对巴拿马 Barro Colorado Island（BCI）50 hm^2 大样地开展森林群落系统发育结构研究，发现 *rbc*L，*mat*K 和 *trn*H-*psb*A 3 个条形码片段单独用于识别木本物种的准确率分别为 69%、70% 和 90%，如果使用 3 个片段组合（*rbc*L+*mat*K+*trn*H-*psb*A），物种鉴定的准确率能可提高至 98%。对我国鼎湖山亚热带地区的群落系统发育的研究表明，*rbc*L，*mat*K 和 *trn*H-*psb*A 3 个条形码片段单独识别木本物种的准确率分别为 70%、70% 和 78%，如果使用 3 个片段组合，准确率能提高至88% 以上（Pei 等，2011）。因此 DNA 条形码不仅可以作为一种快速识别物种的方法，而且在构建群落系统发育关系中也可以发挥重要的作用。

植物 DNA 条形码可以用于分类学研究中，对薄弱区域的物种进行的生态取证或生物多样性调查，并且可以快速评估物种的丰富度，其作为生物多样性快速评估的新工具显示出了强大的潜力。Costion 等（2011）通过对澳大利亚昆士兰东北部 2 个 0.1 hm^2 热带样地的生态学研究，尽管利用 DNA 条形码技术的物种鉴定准确性与以往的研究结果相近，但提高了物种丰富度的估计，达 89%。虽然 DNA 条形码无法辨别所有的植物物种，但是作为一种新的视角和方法，利用条形码数据对生物多样性评价和量化的新方式可

能会弥补物种鉴定率不足的缺点。DNA 条形码技术也可以纠正生态学研究中对物种鉴定的错误。Dexter 等（2010）调查了亚马逊西南部 25 个群落中 *Inga* 属（豆科）的植株近 4 000 株，分类学专家基于形态性状鉴定为 55 个种，但利用 DNA 条形码研究发现，调查的全部植株中有 6.8% ~7.6% 的错误鉴定率，而这种错误的鉴定结果会影响到后续群落生态学的相关分析。因此，利用 DNA 条形码技术，结合传统的分类学方法可使生态学研究中的物种鉴别和生物多样性调查的数据更可靠。

3 DNA 条形码在物种种间关系研究中的应用

植物与传粉者或食果动物之间相互作用，构成了复杂的传粉和取食网络，这种互惠关系对生物多样性维持至关重要（Bascompte 和 Jordano, 2007）。DNA 条形码在研究群落中物种网络关系（如在植食网络和传粉网络等）中已得到成功应用。在动植物间的植食网络关系中，当观察动物的行为存在困难时，可利用动物消化道中的食物残渣，借助 DNA 条形码技术分析其取食的植物，研究野生动物的食性（Passmore 等, 2006; Hulcr 等, 2007; Bourlat 等, 2008）。Valentini 等（2009）利用叶绿体 *trn*L 片段，在哺乳动物，鸟类，昆虫和软体动物的排泄物中快速并有效鉴定出 50% 被动物所取食的植物物种。García-Robledo 等（2013）对美国中部热带雨林中开展植物与取食昆虫之间的网络构建时发现，DNA 条形码同样是一种行之有效的方法。DNA 条形码在生态学大尺度的食性分析、竞争物种间的食性监测及描述生态系统中的食物网开辟了新的途径。从群落水平上研究植物与传粉者之间的互惠关系，为理解群落的结构和动态以及花部特征的演化提供了全新的视角（方强和黄双全, 2012），通过 DNA 条形码构建植物与传粉动物之间的网状拓扑结构，可以从群落水平探讨物种的多样性、系统发育多样性与群落稳定性之间的相互关系。如 Ramírez 等（2011）利用 DNA 条形码和其他分子数据，构建了兰科中特化的兰花类群与其传粉昆虫相互之间的网状关系、分化时间和多样化式样，其研究表明兰花的多样化与传粉昆虫的分化相一致，并与新热带森林中化学环境的分化密切相关。Rafferty 和 Ives（2013）利用 DNA 条形码研究了 14 种草原植物和 22 种为其传粉的昆虫间的相互关系，及其如何响应气候的变化。他们的研究表明气候变化导致植物物候发生变化，进一步导致传粉昆虫的活动时间也随之改变，且不同的植物通过其植株高度、花的颜色和形态来吸引不同的昆虫。通过分析植物性状发现，随着气候变化，很多植物有可能共享相同的传粉昆虫。

DNA 条形码在研究寄生和共生关系时同样是一个有效的工具，可以有效鉴定通过形态很难鉴定的寄主中的寄生生物，并通过对寄生物种及其分布范围和相互网络关系研究探讨寄主转移过程和寄生物种对寄主的选择机制，也可以认识动植物与环境微生物之间的相互作用和分布规律（Besansky 等, 2003）。Roy 和 Lawson（2012）通过 DNA 条形码研究本土和入侵的瓢虫以及体内的寄生物，并从群落水平构建寄生-寄主网络关系，成功将这一网络应用于入侵生态学的研究中。

4 DNA metabarcoding 在生物多样性研究中的应用

应用 DNA 条形码不仅可以针对当前的生物多样性进行有效的评估，也可以对过去的动植物群落的多样性进行评估（Valentini 等, 2009）。DNA 条形码技术的发展将分子操作分类单元（molecular operational taxonomic units: MOTU）引入到生物多样性指数中（Floyd 等, 2002），每一个 MOTU 的丰富度代表了物种的丰富度，该方法常用于环境微生物多样性的估算（Oline, 2006），尽管当样本量很大时该方法存在一定的偏差（Blackwood 等, 2007）。

随着测序技术的发展和测序成本的快速下降，特别是第二代测序（next-generation sequencing, NGS）平台的发展，测序通量呈指数增长（Shendure 和 Ji, 2008; Glenn, 2011）。测序已从原来小尺度上对单个物种的研究开始向大尺度上对多个物种进行研究发展。由于传统的 Sanger 测序方法仅用于单个样本的测序，该技术根本无法满足复杂的混合样品甚至大尺度范围的样品测序的研究，因为这些混合样品通常包含成百甚至上千的个体数。第二代测序技术的出现，产生了

利用高通量测序技术获得条形码基因扩增子序列的方法，称为 DNA metabarcoding 技术。该技术将整个混合样本的 DNA 片段扩增后再进行高通量测序，目前已用于微生物和动物的相关研究中。DNA metabarcoding 方法结合生物信息学手段进行分析，最终从混合样品中自动识别出多个物种，它以快速、可重复、高效及综合性等优点不仅在生物多样性调查方面提供了高效有力的方法，而且在环境监测、资源管理和生物多样性评估等方面具有重要的意义（Taberlet 等，2012a；Yu 等，2012；Ji 等，2013）。无 PCR 扩增的 *PCR-free* metabarcoding 技术（*PCR-free* metabarcoding）的应用还可以推断每个物种中所存在的线粒体 DNA 总量，在生态学中提供了一种全新的方法来评估每个物种的生物量乃至相对丰度，这极大的改变了生态学家对生态系统及生物多样性检测的方法（Zhou 等，2013）。

此外，利用化石数据来重建过去的生态系统往往很困难，因为在自然状态下化石很难被完整的保存下来，并且只通过形态学的证据很难将其准确鉴定到种。通过分子手段和 DNA 条形码的方法可以成功的重建过去的动植物群落。DNA 在低温及干燥的环境下将得以很好的保存，古生态学研究中可利用这些信息，借助 DNA 条形码进行鉴定。Willerslev 等（2003）通过对西伯利亚更新世和全新世时期的永久冻土带沉积物样本进行分析，发现这两个时期植物群落组成有明显的差异，并且鉴定出 8 种不同的哺乳动物，包括猛玛象（*Mammuthus primigenius*）、麝牛（*Ovibos moschatus*），驯鹿（*Rangifer tarandus*）和旅鼠（*Lemmus lemmus*）等。基于同样的方法，Willerslev 等（2007）对从格陵兰岛冰帽底部中收集到的 45 万年前的粉末状冰样品进行分析，发现那个时期格陵兰岛的南部有森林覆盖，植被组成主要为迄今分布于斯堪纳维亚的一些云杉属（*Picea*）、松属（*Pinus*）、桤木属（*Alnus*）植物。因此，DNA 条形码的应用也有助于对过去生物群落和环境变化的认识。

5 环境 DNA 条形码技术在生态学中的应用

早在 1987 年，Ogram 等（1987）就提出了环境 DNA 的概念，即从沉积物中提取微生物的 DNA。然而，直到 2000 年才真正在微生物研究领域研究中得以应用（Rondon 等，2000；Handelsman，2004）。环境 DNA 是指从环境样品（如土壤、空气、水体等）中提取到的 DNA，不对任何目标的生物进行分离。它的特点是包含许多不同生物的基因组 DNA 和可能降解的 DNA 片段，因此，总的环境 DNA 包含了源于活细胞或有机体的 DNA，以及自然细胞死亡或者随后降解的胞外 DNA（Levy-Booth 等，2007；Pietramellara 等，2009）。第二代测序仪平台的应用将环境 DNA 样品直接用来测序，避免了 Sanger 测序中利用克隆或者 PCR 产物测序过程中消耗大量的时间和金钱，因此，环境 DNA metabarcoding（Environmental DNA metabarcoding）可用于更多的生态学研究中（Taberlet 等，2012b），且该技术在快速构建动物取食网络，生物多样性评估、环境监测等领域将得到广泛关注和应用（Yoccoz，2012）。Epp 等（2013）通过对过去和现在的环境 DNA 进行 metabarcoding 研究，所有目标类群都能通过 metabarcoding 的方法检测出来，但是类群之间和不同年代的环境样品所检测的结果存在较大变异范围，如更新世时期的样品中真菌检测成功率最高，同时也可以检测到苔藓植物、甲虫和鸟类的序列，所以环境 metabarcoding 在监测当前和过去生物多样性方面具有重要的应用前景。然而，随着相关技术和方法不断完善，相关生物学信息以及针对特殊问题的具体实验设计以及模型建立和分析仍在不断地发展中，将进一步推动该领域的发展（Pompanon 等，2012；Pińol 等，2013；Quéméré 等，2013；Shokralla 等，2012；Yoccoz，2012）。

6 DNA 条形码在生态学研究中应用的展望

随着 DNA 条形码参考数据库（如 BOLD 等）的不断发展和完善，将进一步促进 DNA 条形码技术在生物学和生态学等相关领域的应用。随着新的测序技术的快速发展和广泛应用，生物信息学的发展，DNA 条形码将对生态学各分支学科的发展做出更大的贡献。

在群落构建机制的研究中，不仅要考虑物种组成在群落生态学中的作用，更需要从系统发育和功能性状维度开展研究。目前将转录组数据引

入到群落系统发育的研究中是将来研究的热点，新一代的高通量转录组测序技术可以直接测定每个转录本的序列，并检测单个碱基差异，通过对转录组信息研究有助于识别与特定条件相关的功能基因。因此，对系统发育、功能性状和转录表达图谱等进行多维度研究，结合环境因子综合探讨多尺度下生物多样性的维持机制，将为研究群落生态学提供全新的视角。此外，伴随着 DNA 条形码技术的发展，特别是相关数据库的完善和新一代植物志 iFlora 的研制，生态学研究将可以在更大的时间和空间尺度上开展，有助于解决一些重大的科学问题。

在未来大科学装置及大数据融合的驱动下，以及科学家的共同努力下，相关数据库不断建立、新软件和新模型不断研发，环境 DNA metabarcoding 将进一步在古生态学、物种分布以及生物多样性评估和监测等领域得到更广泛的应用。与过去认识生物多样性的方式不同，基于第二代测序平台的环境 DNA 条形码技术可在短时间内构建特定时空尺度上的广泛生物类群（动物、植物和微生物）生物多样性的空间分布格局，有助于认识和完善生物多样性分布规律及监测全球气候变化对生物多样性的影响，进一步揭示生态系统中物质循环、能量流动规律。

〔参 考 文 献〕

Ackerly DD, 2004. Adaptation, niche conservatism, and convergence: comparative studies of leaf evolution in the California chaparral [J]. *American Naturalist*, **163**: 654—671

Ahrens D, Monaghan MT, Vogler AP, 2007. DNA-based taxonomy for associating adults and larvae in multi-species assemblages of chafers (Coleoptera: Scarabaeidae) [J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **44**: 436—449

Bascompte J, Jordano P, 2007. Plant-animal mutualistic networks: the architecture of biodiversity [J]. *Annual Review of Ecology and Systermatics*, **38**: 567—593

Besansky NJ, Severson DW, Ferdig MT, 2003. DNA barcoding of parasites and invertebrate disease vectors: what you don't know can hurt you [J]. *Trends in Parasitology*, **19**: 545—546

Blackwood CB, 2007. Interpreting ecological diversity indices applied to terminal restriction fragment length polymorphism data: insights from simulated microbial communities [J]. *Application Environmental Microbiology*, **73**: 5276—5283

Bourlat SJ, Nakano H, Akerman M *et al.*, 2008. Feeding ecology of *Xenoturbella bocki* (phylum Xenoturbellida) revealed by genetic barcoding [J]. *Molecular Ecology Resources*, **8**: 18—22

Brown JH, Gillooly JF, Allen AP *et al.*, 2004. Toward a metabolic theory of ecology [J]. *Ecology*, **85**: 1771—1789

Cadotte MW, Cardinale BJ, Oakley TH, 2008. Evolutionary history and the effect of biodiversity on plant productivity [J]. *Proceedings of the National Academy Sciences of USA*, **105**: 17012—17017

Cadotte MW, Cavender-Bares J, Tilman D *et al.*, 2009. Using phylogenetic, functional and trait diversity to understand patterns of plant community productivity [J]. *PLoS ONE*, **4**: e5695

Cavender-Bares J, Ackerly DD, Baum DA *et al.*, 2004. Phylogenetic overdispersion in Floridian oak communities [J]. *American Naturalist*, **163**: 823—843

Cavender-Bares J, Kozak KH, Fine PVA *et al.*, 2009. The merging of community ecology and phylogenetic biology [J]. *Ecology Letters*, **12**: 693—715

CBOL Plant Working Group, 2009. A DNA barcode for land plants [J]. *Proceedings of the National Academy Sciences of USA*, **106**: 12794—12797

Connell JH, Tracey JG, Webb LJ, 1984. Compensatory recruitment, growth, and mortality as factors maintaining rain forest tree diversity [J]. *Ecological Monographs*, **54**: 141—164

Costion C, Ford A, Cross H *et al.*, 2011. Plant DNA barcodes can accurately estimate species richness in poorly known floras [J]. *PLoS ONE*, **6**: e26841

Davies T, Meiri S, Barraclough T *et al.*, 2007. Species co-existence and character divergence across carnivores [J]. *Ecology Letters*, **10**: 146—152

Dexter KG, Pennington TD, Cunningham CW, 2010. Using DNA to assess errors in tropical tree identifications: How often are ecologists wrong and when does it matter? [J]. *Ecological Monographs*, **80**: 267—286

Epp LS, Boessenkool S, Bellemain EP *et al.*, 2012. New environmental metabarcodes for analysing soil DNA: potential for studying past and present ecosystems [J]. *Molecular Ecology*, **21**: 1821—1833

Fang Q (方强), Huang SQ (黄双全), 2012. Progress in pollination networks: network structure and dynamics [J]. *Biodiversity Science* (生物多样性), **20**: 300—307

Fargione J, Brown CS, Tilman D, 2003. Community assembly and invasion: an experimental test of neutral versus niche processes [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **101**: 8916—8920

Flanagan JL, Brodie EL, Weng L *et al.*, 2007. Loss of bacterial diversity during antibiotic treatment of intubated patients colonized with *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, **45**: 1954—1962

Floyd R, Abebe E, Papert A *et al.*, 2002. Molecular barcodes for soil nematode identification [J]. *Molecular Ecology*, **11**: 839—850

Gao LM (高连明), Liu J (刘杰), Cai J (蔡杰) *et al.*, 2012. A synopsis of technical notes on the standards for plant DNA barcoding [J]. *Plant Diversity and Resources* (植物分类与资源学报), **34**: 592—606

García-Robledo C, Erickson DL, Staines CL *et al.*, 2013. Tropical plant-herbivore networks: reconstructing species interactions using DNA barcodes [J]. *PloS ONE*, **8**: e52967

Gillespie R, 2004. Community assembly through adaptive radiation in Hawaiian spiders [J]. *Science*, **303**: 356—359

Glenn TC, 2011. Field guide to next-generation DNA sequencers [J]. *Molecular Ecology Resources*, **11**: 759—769

Gonzalez MA, Roger A, Courtois EA *et al.*, 2010. Shifts in species and phylogenetic diversity between sapling and tree communities indicate negative density dependence in a lowland rain forest [J]. *Journal of Ecology*, **98**: 137—146

Handelsman J, 2004. Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms [J]. *Microbiology and Molecular Biology Review*, **68**: 669

Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL *et al.*, 2003. Biological identifications through DNA barcodes [J]. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B-Biological Sciences*, **270**: 313—321

Hebert PDN, Penton EH, Burns JM *et al.*, 2004. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator* [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **101**: 14812—14817

Hennig W, 1976. Anthomyiidae [A]. In: Lindner E (ed.), *Die Fliegen der Palaearktischen Region* [M]. Schweizerbart, 329—376

Hollingsworth PM, Graham SW, Little DP, 2011. Choosing and using a plant DNA barcode [J]. *PLoS ONE*, **6**: e19254

Hubbell SP, 2001. *The Unified Neutral Theory of Biodiversity and Biogeography* [M]. Princeton and Oxford: Princeton University Press

Hulcr J, Mogia M, Isua B *et al.*, 2007. Host specificity of ambrosia and bark beetles (Col., Curculionidae: Scolytinae and Platypodinae) in a New Guinea rain forest [J]. *Ecological Entomology*, **32**: 762—772

Janzen DH, 1970. Herbivores and the number of tree species in tropical forests [J]. *The American Naturalist*, **104**: 501—528

Ji Y, Ashton L, Pedley SM *et al.*, 2013. Reliable, verifiable and efficient monitoring of biodiversity via metabarcoding [J]. *Ecology Letters*, **16**: 1245—1257

Kembel SW, Hubbell SP, 2006. The phylogenetic structure of a neotropical forest tree community [J]. *Ecology*, **87**: S86—S99

Knowlton N, 1993. Sibling species in the sea [J]. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **24**: 189—216

Kress WJ, Wurdack KJ, Zimmer EA *et al.*, 2005. Use of DNA barcodes to identify flowering plants [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**: 8369—8374

Kress WJ, Erickson DL, Jones FA *et al.*, 2009. Plant DNA barcodes and a community phylogeny of a tropical forest dynamics plot in Panama [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **106**: 18621—18626

Lahaye R, Van Der Bank M, Bogarin D *et al.*, 2008. DNA barcoding the floras of biodiversity hotspots [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **105**: 2923—2928

Letcher SG, 2010. Phylogenetic structure of angiosperm communities during tropical forest succession [J]. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences*, **277**: 97—104

Levy-Booth DJ, Campbell RG, Gulden RH *et al.*, 2007. Cycling of extracellular DNA in the soil environment [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, **39**: 2977—2991

Li DZ, Gao LM, Li HT *et al.*, 2011. Comparative analysis of a large dataset indicates that internal transcribed spacer (ITS) should be incorporated into the core barcode for seed plants [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **108**: 19641—19646

Li DZ (李德铢), Wang YH (王雨华), Yi TS (伊廷双) *et al.*, 2012. The next generation flora: iFlora [J]. *Plant Diversity and Resources* (植物分类与资源学报), **34**: 525—531

Liu J, Möller M, Gao LM *et al.*, 2011. DNA barcoding for the discrimination of Eurasian yews (*Taxus* L., Taxaceae) and the discovery of cryptic species [J]. *Molecular Ecology Resources*, **11**: 89—100

Liu J, Möller M, Provan J, Gao LM *et al.*, 2013. Geological and ecological factors drive cryptic speciation of yews in a biodiversity hotspot [J]. *New Phytologist*, **199**: 1093—1108

Mouquet N, Leadley P, Meriguet J *et al.*, 2004. Immigra tion and local competition in herbaceous plant communities: a three-year seed-sowing experiment [J]. *Oikos*, **104**: 77—90

Möller M, Gao LM, Mill RR *et al.*, 2013. A multidisciplinary approach reveals hidden diversity in the taxonomically challenging *Taxus wallichiana* complex [J]. *Taxon*, accepted with minor revisions

Nilsson RH, Kristiansson E, Ryberg M *et al.*, 2008. Intraspecific ITS variability in the kingdom Fungi as expressed in the international sequence databases and its implications for molecular species identification [J]. *Evolutionary Bioinformatics*, **4**: 193—201

Ogram A, Sayler GS, Barkay T, 1987. The extraction and purification of microbial DNA from sediments [J]. *Journal of Microbiological Methods*, **7**: 57—66

Oline DK, 2006. Phylogenetic comparisons of bacterial communities from serpentine and nonserpentine soils [J]. *Application Environmental Microbiology*, **72**: 6965—6971

Passmore AJ, Passmore AJ, Jarman SN *et al.*, 2006. DNA as a dietary biomarker in Antarctic krill, *Euphausia superba* [J]. *Marine Biotechnology*, **8**: 686—696

Pei N, Lian JY, Erickson DL *et al.*, 2011. Exploring tree habitat associations in a Chinese Subtropical Forest Plot using a molecular phylogeny generated from DNA barcode Loci [J]. *PLoS ONE*, **6**: e21273

Pietramellara G, Ascher J, Borgogni F *et al.*, 2009. Extracellular DNA in soil and sediment: fate and ecological relevance [J]. *Biology and Fertility of Soils*, **45**: 219—235

Piñol J, San Andrés V, Clare EL *et al.*, 2013. A pragmatic approach to the analysis of diets of generalist predators: the use of next-generation sequencing with no blocking probes [J]. *Molecular Ecology Resources*, doi: 10.1111/1755-0998.12156

Pompanon F, Deagle BE, Symondson WOC *et al.*, 2012. Who is eating what: diet assessment using next generation sequencing [J]. *Molecular Ecology*, **21**: 1931—1950

Quéméré E, Hibert F, Miquel C *et al.*, 2013. A DNA metabarcoding study of a primate dietary diversity and plasticity across its entire fragmented range [J]. *PLoS ONE*, **8**: e58971

Rafferty NE, Ives AR, 2013. Phylogenetic trait-based analyses of ecological networks [J]. *Ecology*, http://dx.doi.org/10.1890/12-1948.1

Ramírez SR, Eltz T, Fujiwara MK *et al.*, 2011. Asynchronous diversification in a specialized plant-pollinator mutualism [J]. *Science*, **333**: 1742—1746

Ricklefs RE, 1987. Community diversity: relative roles of local and regional processes [J]. *Science*, **235**: 167—171

Ricklefs RE, 2004. A comprehensive framework for global patterns in biodiversity [J]. *Ecology Letters*, **7**: 1—15

Rondon MR, August PR, Bettermann AD *et al.*, 2000. Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, **66**: 2541—2547

Roy HE, Lawson Handley LJ, 2012. Networking: a community approach to invaders and their parasites [J]. *Functional Ecology*, **26** : 1238—1248

Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S *et al.*, 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **109**: 6241—6246

Shendure J, Ji H, 2008. Next-generation DNA sequencing [J]. *Nature Biotechnology*, **26**: 1035—1045

Shokralla S, Spall JL, Gibson JF *et al.*, 2012. Next-generation sequencing technologies for environmental DNA research [J]. *Molecular Ecology*, **21**: 1794—1805

Sogin ML, Morrison HG, Huber JA *et al.*, 2006. Microbial diversity in the deep sea and the underexplored 'rare biosphere' [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**: 12115—12120

Swenson NG, 2011. Phylogenetic beta diversity metrics, trait evolution and inferring the functional beta diversity of communities [J]. *PLoS ONE*, **6**: e21264

Taberlet P, Coissac E, Pompanon F *et al.*, 2012a. Towards next-generation biodiversity assessment using DNA metabarcoding [J]. *Molecular Ecology*, **21**: 2045—2050

Taberlet P, Coissac E, Hajibabaei M *et al.*, 2012b. Environmental DNA [J]. *Molecular Ecology*, **21**: 1789—1793

Tilman D, Knops J, Wedin D *et al.*, 1997. The influence of functional diversity and composition on ecosystem processes [J]. *Science*, **277**: 1300—1302

Valentini A, Miquel C, Nawaz MA *et al.*, 2009. New perspectives in diet analysis based on DNA barcoding and parallel pyrosequencing: the *trn*L approach [J]. *Molecular Ecology Resources*, **9**: 51—60

Valentini A, Pompanon, Taberlet P, 2009. DNA barcoding for ecologists [J]. *Trends in Ecology & Evolution*, **24**: 110—117

Webb CO, Ackerly DD, McPeek MA *et al.*, 2002. Phylogenies and community ecology [J]. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **33**: 475—505

Willerslev E, Hansen AJ, Binladen J *et al.*, 2003. Diverse plant and animal genetic records from Holocene and Pleistocene sediments [J]. *Science*, **300**: 791—795

Willerslev E, Cappellini E, Boomsma W *et al.*, 2007. Ancient biomolecules from deep ice cores reveal a forested southern Greenland [J]. *Science*, **317**: 111—114

Wright DH, 1983. Species-energy theory: an extension of species-area theory [J]. *Oikos*, **41**: 496—506

Yoccoz NG, 2012. The future of environmental DNA in ecology [J]. *Molecular Ecology*, **21**: 2031—2038

Yu DW, Ji Y, Emerson BC *et al.*, 2012. Biodiversity soup: metabarcoding of arthropods for rapid biodiversity assessment and biomonitoring [J]. *Methods in Ecology and Evolution*, **3**: 613—623

Zhou X, Li Y, Liu S *et al.*, 2013. Ultra-deep sequencing enables high-fidelity recovery of biodiversity for bulk arthropod samples without PCR amplification [J]. *GigaScience*, **2**: 4. doi: 10.1186/2047-217X-2-4

Zobel M, Moora M, Haukioja E, 1997. Plant coexistence in the interactive environment: arbuscular mycorrhiza should not be out of mind [J]. *Oikos*, **78**: 202—208